CHARAKTERISIERUNG VON MENSCHLICHEM SUBMANDIBULARISSEKRET, UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER DISKELEKTROPHORETISCHEN EIWEISSAUFTRENNUNG, DES GESAMTEIWEISSES UND DER BESTIMMUNG VON IMMUNGLOBULIN-A, LYSOZYM, DER ELEKTROLYTE Na, K, Ca UNTER RUHE UND REIZ.

Bernd Kölmel

1979

Aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik
der Universität München
Direktor: Professor Dr. H. - H. Naumann

Charakterisierung von menschlichem Submandibularissekret, unter Berücksichtigung der diskelektrophoretischen Eiweißauftrennung, des Gesamteiweißes und der Bestimmung von Immunglobulin-A, Lysozym, der Elektrolyte Na, K, Ca unter Ruhe und Reiz.

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt
von
Bernd Kölmel
aus
Haßfurt
Jahr
1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. H. Eichner

Mitberichterstatter: Professor Dr. H.-H. Naumann

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.1.1979

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

A) Einleitung

B) Theoretischer Teil

1. Zur Abnahmetechnik und dem Sekretionsverhalten der Submandibularisdrüsen
2. Proteine
   a) Zur Gesamtproteinausscheidung und ihrer Bestimmung
   b) Diskelektrophorese
3. Lysozym
4. Ig-A
5. Elektrolyte Na, K und Ca

C) Methodischer Teil

1. Flußraten
   a) Patientengut
   b) Sekretgewinnung
2. Proteine
   a) Gesamtprotein
   b) Diskelektrophorese

3. Lysozym

4. Ig-A

5. Elektrolyte Na, K und Ca

D) Ergebnisse

1. Flußraten

2. Proteine

   a) Gesamtprotein

   b) Diskelektrophorese

3. Lysozym

4. Ig-A

5. Elektrolyte Na, K und Ca

E) Diskussion

F) Zusammenfassung

A) Einleitung

Schon die Betrachtung einiger Funktionen der menschlichen Speicheldrüsensekrete, wie Reinigung und Schutz der Schleimhaut und Zähne, Verdauungsvorbereitung der aufgenommenen Nahrung, Vermittlerrolle bei der Geschmacksempfindung, zeigt uns die große physiologische Bedeutung für den Gesamtorganismus. Das Sekretionsverhalten und die Zusammensetzung des menschlichen Speichels sind daher seit vielen Jahren Gegenstand wissenschaftlicher Forschung.

Um Informationen über Funktion, sowie über die biochemischen Bestandteile der Sekrete von menschlichen Speicheldrüsen zu erhalten, bedurfte es zunächst geeigneter Verfahren, mit deren Hilfe man die Sekrete der Gl.parotis und der Gl.submandibularis voneinander getrennt sammeln konnte.

Die in der Literatur vorliegenden Daten sind untereinander schwer zu vergleichen. Das hat verschiedene Ursachen:

1) Die Anwendung verschiedener biochemischer Verfahren bei der Analyse der Speichelsekrete
2) Unterschiedliche Methoden bei der Gewinnung

der Speichelsekrete

3) Physiologische Faktoren, die die Sekretion der menschlichen Speicheldrüsen und die Zusammensetzung beeinflussen, wie z. B. Hormonhaushalt, Alter, Geschlecht, Essensgewohnheiten, Plasmaspiegel der untersuchten Stoffe, Psyche, zirkadiane Schwankungen und Medikamente (1), (2).

Nach dem derzeitigen Stand der Kenntnisse kann nur eine Speichelchemie von klinischer Bedeutung sein, die mit getrennter, reproduzierbarer Abnahme der Sekrete, unter Berücksichtigung aller beeinflussenden Faktoren arbeitet.

B) Theoretischer Teil

1. Zur Abnahmetechnik und dem Sekretionsverhalten der Submandibularisdrüsen

Das Problem der fraktionierten Gewinnung von Sekreten der Speicheldrüsen versucht man durch eine Reihe verschiedener Abnahmeverfahren zu lösen.
Die gebräuchlichsten Techniken zur Gewinnung von Submandibularissekret sind die folgenden:
Eine speziell auf die Schleimhaut des jeweiligen Probanden angepaßte Plastikprothese, die die Ausführgänge umschließt, eine mit Unterdruck arbeitende Saugkappe, der Lashley-Kollektor und der in dieser Arbeit verwendete Poly-vinyl-katheter.
Der Nachteil der erstgenannten Methode besteht in dem erforderlichen technischen und zeitlichen Aufwand zur Fertigung der Prothesen; außerdem ist die isolierte Abnahme einer einzelnen Drüse nicht möglich. Das Gleiche gilt auch für die Verwendung der Saugkappe. Hinzu kommt, daß durch den Reiz des Ansaugens, eine Unterscheidung zwischen Ruhe- und Reizsekret fraglich wird.

Schwierigkeiten bei der Verwendung des Poly-vinyl-katheters ergeben sich zum einen beim Einführen

der Kanüle in die Orifizien der Ausführgänge, zum anderen durch das relativ leichte Herausrutschen des Katheters durch mechanische Einflüsse, wie zum Beispiel Zungenbewegungen.

Im Hinblick auf die spätere klinische Verwendbarkeit derartiger Untersuchungsmethoden erscheint dennoch insgesamt die Benutzung eines Katheters als die derzeit beste Methode.

2. Proteine

a) Zur Gesamtproteinausscheidung und ihrer Bestimmung

Die bisher in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse über die Gesamtproteinkonzentrationen differieren erheblich. Skurk und Mitarbeiter und Arneberg zeigten, daß je nach Methode die Ergebnisse bis um das Vierfache schwanken (4), (5). Unterschiedliche Ergebnisse finden sich auch für das Verhalten der Proteine mit steigender Flußrate. Es werden sowohl starker Abfall als auch Anstieg der Proteinkonzentrationen beschrieben.

Eine Standardmethode der Gesamteiweißbestimmung in Körperflüssigkeiten ist die Biuret-Methode. Während sie sich durch ihre einfache Handhabung und hohe Spezifität auszeichnet, besteht ihr Nachteil in ihrer geringen Empfindlichkeit. So liegt die Eiweißkonzentration des menschlichen Speichels unter der Nachweisgrenze der Biuret-Methode. Zur Messung niedriger Eiweißkonzentrationen modifiziert man daher die Standardmethode. Es werden verschiedene Verfahren angewendet: Man erhöht die Eiweißkonzentration durch vorherige Fällung (6) oder steigert die Empfindlichkeit durch Messung des Protein-Kupfer-Komplexes im UV-Bereich (7), (8). Alle erwähnten Methoden bedingen jedoch einen höheren zeitlichen und apparativen Aufwand.

Wir verwendeten daher eine von Maurer (9) entwickelte Methode zur Schnellbestimmung von Gesamteiweiß im Liquor cerebrospinalis. Maurer erreicht eine Erhöhung der Empfindlichkeit mit Hilfe einer stark alkalischen Lösung von Cu-II-Sulfat in 40 %-igem Äthylenglykoll.

b) Diskelektrophorese

Die niedrige Eiweißkonzentration des menschlichen

Speichels verlangt die Verwendung einer im Vergleich zu gebräuchlichen Auftrennungsmethoden, wie Papier- oder Zelluloseacetatelektrophorese, empfindlichere elektrophoretische Auftrennung. Als geeignet erschien uns hierzu die Diskelektrophorese, die erstmals von Caldwell und Pigman (10) zur Auftrennung von menschlichem Speichel angewandt wurde.

Die Diskelektrophorese stellt ein hinsichtlich Pufferzusammensetzung, Porengröße und Ph-Wert diskontinuierliches Trennsystem dar. Zwei physikalische Effekte ermöglichen eine schärfere Auftrennung der Eiweißfraktionen.
Ein Konzentrierungseffekt:
Durch Ph-Unterschiede zwischen Sammel- und Trenngel werden die aufgetragenen Eiweiße vor ihrer Trennung konzentriert.
Ein Molekularsiebeffekt:
Durch die Beschaffenheit des Gels werden die Eiweiße, neben der elektrischen Ladung, nach ihrer Größe und Gestalt aufgetrennt. Das heißt: Bei Proteinfraktionen gleicher Ladung kommt es zu einer Auftrennung nach unterschiedlichem Molekulargewicht und unterschiedlicher Tertiärstruktur.

Bei Voruntersuchungen mit Parotissekret bewährte sich ein 7,5 %-iges Acrylamid-Mittelporgel mit einem Ph von 8,8 und einer Porenweite von 50 Angström. Es trennt Proteingemische mit Molekulargewichten von 10^4 bis 10^6 auf. Der optimale Trennbereich liegt bei $3 \cdot 10^5$ bis 10^6. Das Polyacrylamid-Gel entsteht durch Polymerisation von Acrylsäureamid, CH_2-CH-CO-NH_2, mit einem Vernetzer, N,N-methylbisacrylsäureamid.
Der Polymerisationsgrad und der Vernetzungsgrad bestimmen Viskosität und Festigkeit des Gels.

3. Lysozym

Das Lysozym ist, seit seiner Entdeckung durch Fleming und Ellison (11) im Jahre 1922, Gegenstand zahlreicher Forschungen gewesen. Zunächst wurde es wegen seiner Eigenschaften den Enzymen zugeordnet. Das Wissen um Bestandteile, Struktur und Funktion des Lysozyms hat sich seitdem erweitert.
Es handelt sich um ein basisches Polypeptid mit einem isoelektrischen Punkt um 11,0 und einem Molekulargewicht von ca. 14 000. Es ist säurestabil und bewirkt Lyse bestimmter Bakterien, wie Meningokokken, Gonokokken, hämolytischer

Streptokokken und einiger Staphylokokken. Die Lyse beruht auf der Hydrolyse eines Bakterienwandbestandteiles, wahrscheinlich eines Mukoproteins. Diskutiert wird eine von Humphrey und White (12) behauptete Beziehung zwischen Ig-A und Lysozym. Ig-A soll in Gegenwart des Lysozyms antibakteriell wirksam sein.

4. Ig-A

Die Immunglobulinzusammensetzung der Sekrete unterscheidet sich von der des Serums. Während Ig-A im Serum nur ein Sechstel aller Immunglobuline ausmacht, bildet es im Speichel den Hauptanteil. Speichel-Ig-A unterscheidet sich von Serum-Ig-A durch eine Reihe physikalischer und strukturchemischer Eigenschaften, obwohl es mit Serum-Ig-A kreuzreagiert. Es ergibt sich gegenwärtig folgendes Bild:
In der Ausbildung von kovalenten Bindungen untereinander und zu einem Glykoprotein, bezeichnet als Secretorypiece, beziehungsweise als sogenannte J-Kette, bilden zwei monomere Ig-A-Moleküle eine komplexe Verbindung. Die Ig-A-Anteile des Moleküls werden in den Plasmazellen synthetisiert, das J-Stück dagegen in den Epithelzellen der Schleimhäute (13), (14), (15).

Synthese und Funktion des Speichel-Ig-A sind jedoch nach wie vor nicht befriedigend geklärt. Zwar ließ sich durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (von Krayenbühl und Hürlimann, (16)) eine Lokalisation der Secretory-Ig-A-Synthese vor allem im rauhen Endoplasmatischen Reticulum der Sekretionsgranula und im Golgiapparat nachweisen, der Ort der Kopplung der Secretorykomponente konnte jedoch noch nicht sicher bestimmt werden. Widersprüche zeigen sich auch bei der Frage, ob es eine selbständig gesteuerte Speichelimmunglobulinsynthese gibt. Einerseits konnte Brandtzaeg (17) eine lokale Synthese der Speicheldrüsenimmunglobuline nachweisen, andererseits zeigen andere Untersuchungen, daß Abwesenheit von Ig-A im Serum auch eine Abwesenheit von Ig-A im Speichel zur Folge hat.

5. Elektrolyte: Na, K, Ca

Die Elektrolyte gehören zu den am besten untersuchten Bestandteilen des Speichels (18), (19). Neben umfangreichen Normalbefunden konnte man typische Elektrolytverschiebungen bei bestimmten Erkrankungen der Speicheldrüsen feststellen. Bei entzündlichen Erkrankungen kommt es zu einer

Vermehrung von Na und Cl bei gleichzeitiger Verminderung von K und anorganischem Phosphat. Für Gialome kennt man ebenso spezifische Elektrolytverschiebungen. Da die selektive Gewinnung des Sekretes der Gl.parotis einfacher ist, beruhen derartige Ergebnisse meist auf Untersuchungen mit Parotissekret.

C) Methodischer Teil

1. Flußraten

a) Patientengut

Es wurde das Sekret beider Gl.submandibulares von 15 Probanden untersucht. Erkrankungen der Patienten, die den Verlauf der Untersuchung beeinträchtigt hätten,wurden anamnestisch und laborchemisch ausgeschlossen. Das Alter der untersuchten Personen lag zwischen 25 und 35 Jahren. Davon waren 12 Personen Männer und 3 Frauen.

b) Sekretgewinnung

Der Ausführgang der beiden Gl.submandibulares wurde mit Hilfe je eines Polyvinylkatheters kanüliert. Der Gesamtdurchmesser des Katheters betrug einen Millimeter, sein Innendurchmesser 0,5 Millimeter. Der Katheter wurde etwa 20 mm in den Gang eingeführt und anschließend fixiert. Das abfließende Sekret wurde in einem Fraktionsteiler in graduierten Zentrifugengläsern aufgefangen. Während der gesamten Abnahme wurde der gesammelte Speichel durch Eiswasser gekühlt.
Wir sammelten 10-Minuten-Fraktionen. Die erste

Fraktion wurde verworfen, Nach 30 Minuten wurde die Sekretion gustatorisch durch Gabe von Ascorbinsäure in Form von Lutschtabletten (100 mg/10 Min.) stimuliert. Nach 40-minütiger Ascorbinsäuregabe wurde der Reiz beendet und zwei weitere 10-Minuten-Fraktionen gesammelt. Nach Beendigung der Abnahme wurde die sezernierte Menge der einzelnen Fraktionen gemessen und unmittelbar daran anschließend im Labor getestet.

2. Proteine

a) Gesamtproteinbestimmung

1,5 g Kupfersulfat werden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst und mit 40 ml Äthylenglykol vermischt. Unter ständigem Rühren wird mit 2 n NaOH auf 100 ml aufgefüllt. Die Haltbarkeit dieser Lösung ist unbegrenzt. Die Messung der optischen Dichte erfolgt nach fünf Minuten im Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 546 nm. Leerwert: 2 ml H_2O und 0,4 ml des hergestellten Reagenz.

Abweichend von der von Maurer (9) angegebenen Methode diente uns als Bezugsstandard nicht eine Rinderalbuminlösung, sondern die aus lyophilisiertem und dialysiertem Parotissekret gewonnene

Trockensubstanz. Nach Herstellung einer Eichlösung von 20 mg/ml Protein und Einsetzen verschiedener Konzentrationen von 0,5 bis 20 mg erstellten wir eine Eichkurve. Durch Vergleich der Extinktionen der Speichelproben mit der Eichkurve bestimmten wir die Gesamteiweißkonzentrationen.

b) Diskelektrophorese

1. Herstellung der benötigten Lösungen

a: Gel

Lösung 1:

1 n HCL		480 ml
Tris-hydroxymethyl-aminomethan		366 g
Temed		0,23 ml
Aqua dest.	ad	1000 ml

Lösung 2:

Acrylamid		300 g
Bisacrylamid		28,8 g
Aqua dest.	ad	1000 ml

Lösung 3:

Ammoniumperoxidsulfat		600 mg
Aqua dest.	ad	1000 ml

Lösung 1 und 2 sind haltbar und können in dunklen Flaschen aufbewahrt werden, Lösung 3 muß jeweils frisch zubereitet werden. Die Lösungen werden zur Gelpolymerisation folgendermaßen gemischt:

Aqua dest.	:	1 Teil
Lösung 1	:	1 Teil
Lösung 2	:	2 Teile
Lösung 3	:	4 Teile

b: Elektrodenpuffer

Tris-glycin-Puffer ph 8,3:

Tris	6,0 g
Glycerin	28,8 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

Der so hergestellte Puffer wurde in dunklen Glasflaschen abgefüllt und im Kühlschrank aufbewahrt. Für den Elektrophoreseversuch wurde daraus, durch Verdünnung mit Aqua dest. auf das Zehnfache, der Elektrodenpuffer zubereitet. Der Puffer wurde nur einmal pro Elektrophoreselauf verwendet, da der Ph sich, wie Messungen vor und nach dem Lauf zeigten, veränderte. Dadurch waren für jeden Lauf gleiche Bedingungen gegeben.

c: Färbung

1 %-ige Lösung aus Coomassie G 250

1 Teil dieser Lösung in 19 Teilen

10 %-iger Trichloressigsäure.

Entfärbung in einem 7 %-igen Essigsäurebad

2. Apparative Ausrüstung und Durchführung der Elektrophorese

Wir verwendeten ein Elektrophoresegerät der Firma WTW, Weilheim, Typ DEA 90. In dieses Gerät können 16 Glasröhrchen eingesetzt werden. Die Glasröhrchen haben eine Länge von ca. 15 cm, Ihr Innendurchmesser beträgt 6 mm, ihr Außendurchmesser 9 mm. Das Gerät ist mit einer Kühlvorrichtung versehen.

Die Durchführung eines elektrophoretischen Laufes beinhaltet folgende Vorgänge:
Die Glasröhrchen werden auf einer der beiden Seiten mit "Parafilm" abgedichtet. Die in dem oben beschriebenen Mischungsverhältnis hergestellte Lösung für das Gel wird etwa 10 cm hoch gleichmäßig in die Röhrchen eingefüllt. Mit Hilfe einer Injektionsspritze wird nun das Gel mit Aqua dest. vorsichtig überschichtet um es luftdicht abzu-

schließen. Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, dies dauert etwa eine Stunde, wird das Wasser abgesaugt und der Parafilm entfernt.
Die Glasröhrchen werden jetzt in den Elektrophoreseapparat so eingesetzt, daß sie etwa 3 cm in die obere Kammer überstehen. Die untere Kammer wird mit Tris-Glycin-Puffer bis zur Markierung gefüllt und die obere Kammer mit den eingesetzten Röhrchen auf diese aufgesetzt, so daß die Gelröhrchen in den Puffer der unteren Kammer eintauchen. Die Probe, 0,1 ml Submandibularissekret pro Röhrchen, wird nun auf das Gel aufgetragen und mit Puffer vorsichtig überschichtet. Dann wird die obere Kammer mit Puffer aufgefüllt und zwei Milliliter einer 0,001-%-igen Thymolblaulösung hinzugegeben. Die Thymolblaubande läuft den Proteinbanden voraus und markiert so die Front.
Die Wasserkühlung wird angestellt, der Elektrophoreseapparat verschlossen und die Elektroden an ein Gleichstromgerät angeschlossen, die obere Kammer am Plus-, die untere am Minuspol. Der Lauf teilt sich in Vor- und Hauptlauf.
Während des 10 minütigen Vorlaufs fließt ein Strom von 2 mA/Gel, bei 16 Röhrchen also ein Strom von 32 mA, während des Hauptlaufes 5 mA/Gel, also ein Strom von 80 mA. Sobald die Thymolblaubande

das Gelende erreicht hat, werden die Gele aus den Glasröhrchen gelöst. Dazu wurde mittels einer dünnen Injektionskanüle vorsichtig eine 50 %-ige Glycerinlösung zwischen Gel und Glaswand gespritzt. Die Gele wurden in 10 %-iger Trichloressigsäure fixiert und anschließend in Reagenzgläser mit Färbelösung gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Gele 48 Stunden lang in einem 7 %-igen Essigsäurebad entfärbt und zur Dokumentation photographiert.

3. Lysozym

Bei der Lysozymbestimmung wurden die Proben auf speziell hergestellte Agaroseplatten aufgetragen.
Herstellung des Agarosegels:
5 g Agarose (Behringwerke, Marburg) werden bei Raumtemperatur in 50 ml Na-K-Phosphatpuffer suspendiert. Der Sörensen Na-K-Phosphatpuffer besteht aus 81,5 ml einer Lösung von 11,88 g Dinatriumhydrogenphosphat in 1000 ml H_2O.
Die suspendierte Agarose wird durch Rühren mit 450 ml des Puffers bis zur Klärung gekocht und 50 mg äthylmercurithiosalicylsaures Na-Salz (Merthiolat) darin gelöst. Das Agarosegel wird luftdicht verschlossen in 100 ml-Portionen aufbewahrt.

Vor Gebrauch werden in 100 ml aufgekochtem und auf 63° abgekühltem Agar 100 mg lyophilisierte Mikrococcus lysodeicticus-Zellen (Serva, Heidelberg) gleichmäßig suspendiert. Die so gewonnene Suspension wird in 5 ml-Portionen in Petrischalen eingefüllt. Nach Erkalten stanzt man mit der Saugstanze 16 gleich große Löcher aus. Auf die fertigen Platten werden mit Hilfe einer Mikrolitherspritze die Proben in die Löcher eingefüllt. Nach 16 Stunden wird der Durchmesser der Klärungszonen gemessen und an Hand einer Eichkurve die Lysozymkonzentration abgelesen. Zur Erstellung der Eichkurve verwenden wir zweimal umkristallisiertes, salzfreies, lyophilisiertes, reinstes Lysozym (Hühnereiweißlysozym LYSF der Fa. Worthington Biochem. Corp. New Jersey).

4. Ig-A

Zur Speichel-Ig-A-Bestimmung wurden LC-Partigen Immundiffusionsplatten der Behringwerke Marburg benutzt.
In die zwölf ausgestanzten füllt man 0,02 ml der Probe mit der Hamilton-Mikrolitherspritze ein. Nach 48 Stunden wird der Präcipationsdurchmesser mit einer Schablone bestimmt. Die Eich-

kurve erstellt man mittels Standard-Ig-A der Behringwerke.

5. Elektrolyte K, Na, Ca

Die Elektrolyte K, Na und Ca des Submandibularissekretes bestimmten wir mit einem Eppendorf-Flammenphotometer analog der Serumelektrolytbestimmung.

Prinzip:

Die zu untersuchenden Seren, der Standard und die Kompensations-Lösung werden mit der gleichen netzmittelhaltigen Lithium-Lösung (Null-Lösung) verdünnt.

Herstellung der Lösungen:

O-Lösung: Man gibt 5 ml Lithium-Stammlösung in einen 500 ml Meßkolben und füllt mit Aqua bidest. bis zur Markierung auf.

Standard:

K, Ca: Eppendorf-Standard-Stamm-Lösung
Mischungsverhältnis 1 : 201

Na: Eppendorf-Standard-Stamm-Lösung
Mischungsverhältnis 1 : 21

Kompensations-Lösung:

Eppendorf-Kompensations-Stamm-Lösung
Mischungsverhältnis 1 : 21

Herstellung der Probelösungen:

K, Ca: Kompensations-Lösung: Ca
10 ml O-Lösung
+500 µl Kompensations-Lösung

Standard: K, Ca
10 ml O-Lösung
+500 µl Standard

Probe:
10 ml O-Lösung
+500 µl Probe

Na: Standard:
10 ml O-Lösung
+ 50 µl Standard

Probe:
10 ml O-Lösung
+ 50 µl Probe

Vom Hersteller sind für das Gerät folgende Normalwerte für Serum angegeben:

Na: 135 - 145 mval/l
K : 3,8 - 5,0 mval/l
Ca: 4,5 - 5,5 mval/l

D) Ergebnisse

1. Flußraten

Die Ruhesekretion der untersuchten Personen liegt bei Werten zwischen 0,1 und 0,36 ml pro min. pro Drüse. Ascorbinsäurereiz führt zu einem deutlichen Anstieg der Sekretion auf Werte bis zu 0,5 ml pro min. pro Drüse, im Mittelwert etwa 0,35 ml pro min. pro Drüse. Nach Beendigung der Stimulation durch Ascorbinsäure kehrt die Sekretion rasch auf ihren Ausgangswert zurück. Siehe Abb. 1.

2. Proteine

a) Gesamtproteinausscheidung

Die Gesamtproteinausscheidung liegt bei Ruhesekretion in einem Bereich um 4 mg pro min. pro Drüse. Ascorbinsäurereiz führt zu einem Anstieg auf mittlere Werte im Bereich zwischen 4,5 und 6 mg pro min. pro Drüse. Nach Beendigung des Reizes rasche Rückkehr auf den Ausgangswert.
Insgesamt läßt sich sagen, daß sich ein klarer Verlauf der Mittelwerte ergibt: von den Ruhewerten ausgehend, erfolgt ein Anstieg unter Reiz, dem sich die Rückkehr auf die Ausgangswerte nach Reizbeendigung anschließt.

Die Streubreite der einzelnen Werte ist jedoch sehr hoch. So finden sich im Bereich der Ruhesekretion Werte bis zu 7 mg, während des Reizes aber auch Werte um 2 mg.

Die Proteinkonzentration ergibt Ruhewerte von 0,3 bis 3 mg pro ml. Hier zeigt sich unter Reiz ein Absinken der Werte und nach Reizbeendigung eine Rückkehr auf die Ausgangswerte. Auch hier lassen die gefundenen Werte im Gesamten den beschriebenen Verlauf erkennen, einzelne Werte einzelner Fraktionen fallen jedoch heraus.

Siehe Abb. 2 und 3.

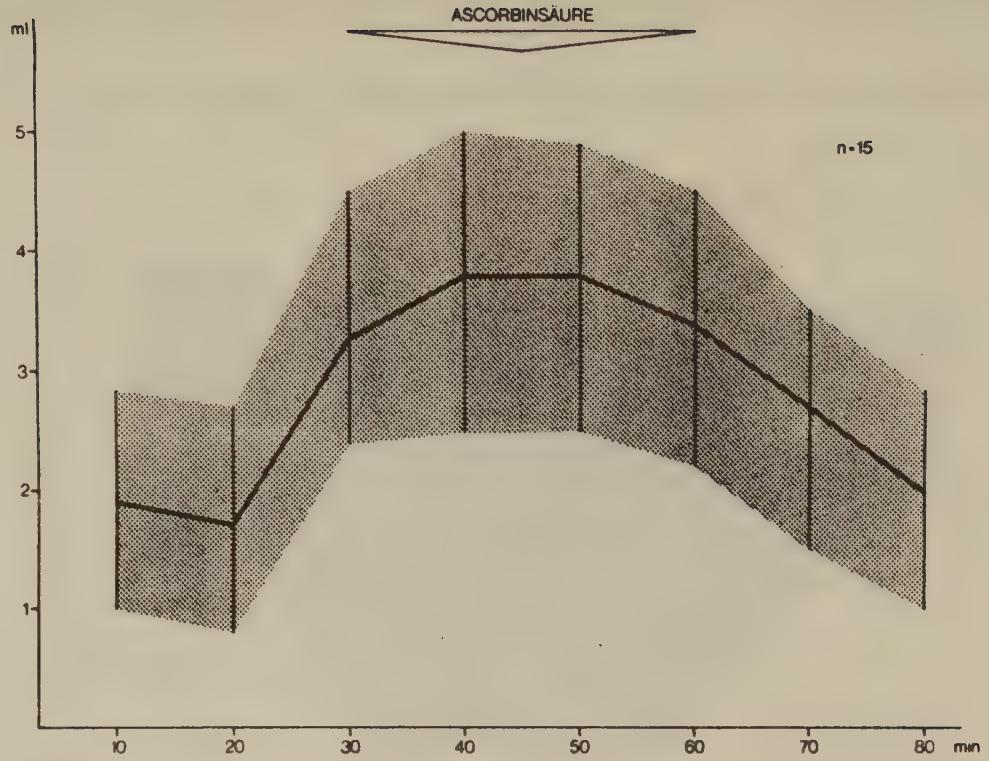

Abb.1

Flußrate der Submandibularisdrüse bei Ruhe und Ascorbinsäurereiz

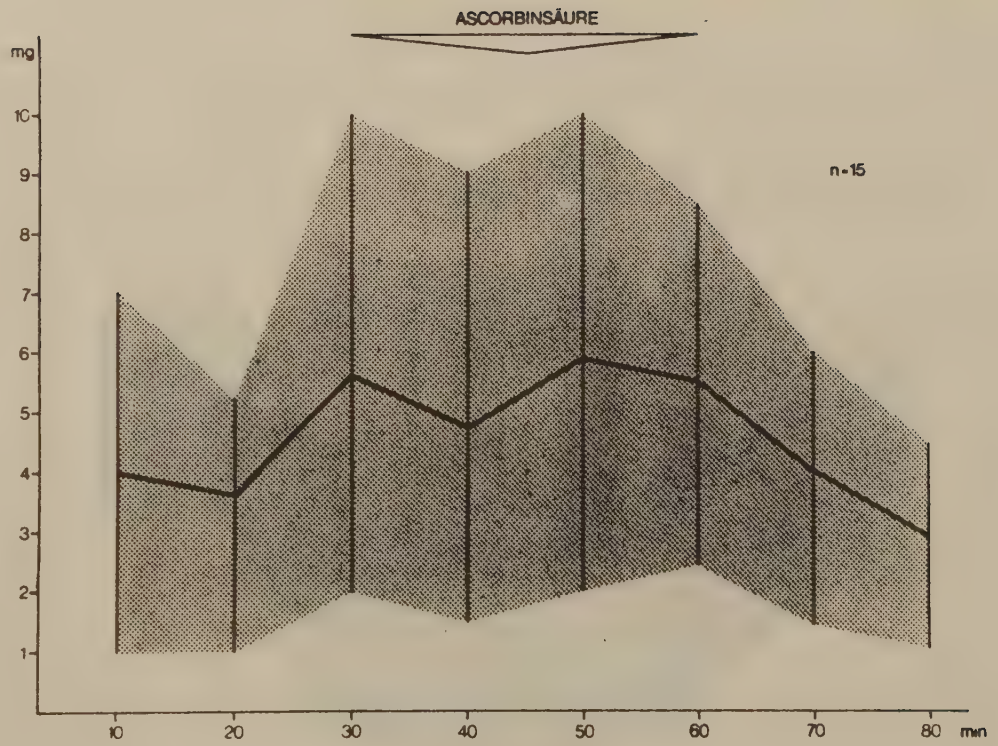

Abb. 2

Gesamteiweißmenge im Submandibularissekret bei Ruhe und Ascorbinsäurereiz

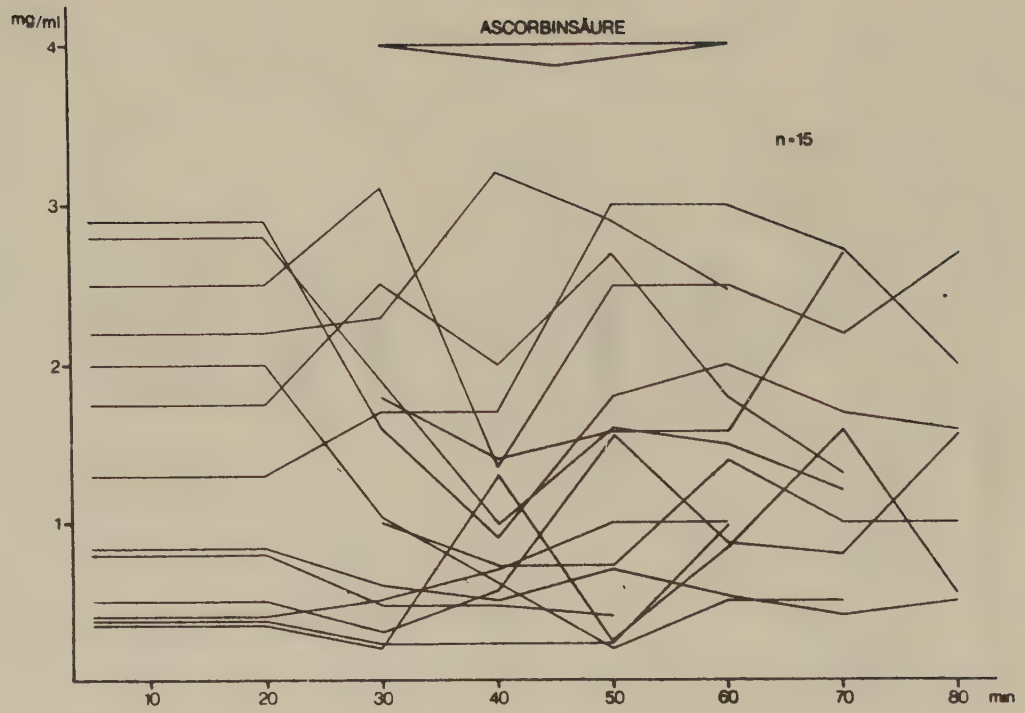

Abb. 3

Gesamteiweißkonzentration im Submandibularissekret bei Ruhe und Ascorbinsäurereiz

b) Diskelektrophorese

Die gefärbten Gele zeigen eine Reihe von Banden, die wir, von der Auftragsstelle ausgehend, alphabetisch mit den Buchstaben a bis k bezeichnet haben. Sie sind in Abb. 4 schematisch, jeweils für Ruhe- und Reizsekret dargestellt.

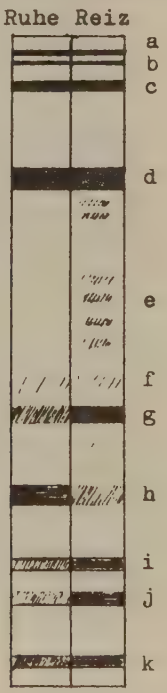

Abb. 4

Schematische Darstellung der Eiweißbanden eines Ruhe- und Reizsekretes.

Im Vergleich der bei Ruhe und Reiz gefundenen Banden läßt sich folgendes sagen:

I. Bandenmuster

a: Unabhängig von Ruhe oder Reiz sind in allen Fraktionen die Banden a,b,c,d,g,h,i,j und k vorhanden.

b: Die Banden e und f stellen sich in einzelnen Fraktionen überhaupt nicht dar. Es sind dies in der Mehrzahl der Fälle, jedoch nicht immer die Ruhefraktionen.

II. Farbintensität der Banden

a: Die Farbintensität der Banden a,b,c ist unter Stimulation geringer als in den Ruhefraktionen.

b: Die Bande d zeigt konstante oder in den Reizfraktionen leicht zunehmende Farbintensität.

c: In den Fraktionen, in denen sich die Bandenmuster e und f darstellen, lassen sich keine Unterschiede in der Farbintensität feststellen.

d: Die Farbintensität der g-Bande nimmt unter Reiz zu und wird im Ruhesekret wieder schwächer.

e: Die h-Bande nimmt unter Reiz deutlich ab, verschwindet zum Teil ganz und wird wieder in den Ruhefraktionen sichtbar.

f: Die Banden i, j und k verhalten sich umgekehrt zur Bande h. Ihre Farbintensität nimmt unter Reiz zu und schwächt sich im Ruhesekret ab. Am ausgeprägtesten zeigt diesen Verlauf die i-Bande.

Abb. 5

Submandibularissekret bei Ruhe 1 und 2, bei Ascorbinsäurereiz 3,4,5,6 und wieder bei Ruhe 7 und 8.

3. Lysozym

Die Ruhewerte der Lysozymgesamtausscheidung ergeben eine starke Streuung mit Werten von 40 bis 200 µg. Es finden sich einzelne Werte bis zu 400 µg. Die graphische Darstellung zeigt einen kontinuierlichen Abfall der Werte, der sich unter Ascorbinsäurereiz fortsetzt. Ab der vierten Fraktion stellen die Werte sich auf ein gleichbleibendes Niveau im Bereich von 50 µg ein. Die Streubreite nimmt mit zunehmender Dauer der Sekretion deutlich ab.

Die Lysozymkonzentration zeigt einen starken Abfall der gefundenen Ruhewerte von ca. 18 bis 100 µg/ml auf Werte vorwiegend im Bereich zwischen 1 und 2 µg/ml während des Reizes. Nach Beendigung der Stimulierung steigen die Werte wieder leicht an, ohne ihren Ausgangswert zu erreichen.
Siehe Abb. 6 und 7.

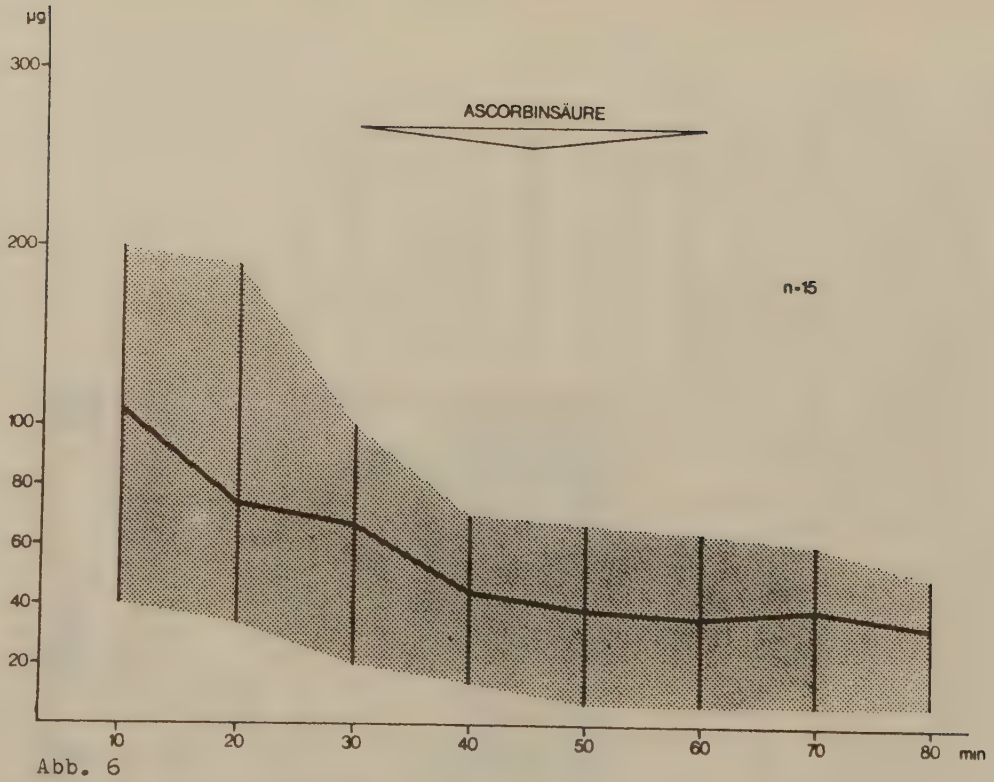

Abb. 6

Lysozymgesamtausscheidung im Sekret der Gl.submandibularis bei Ruhe und Ascorbinsäurereiz

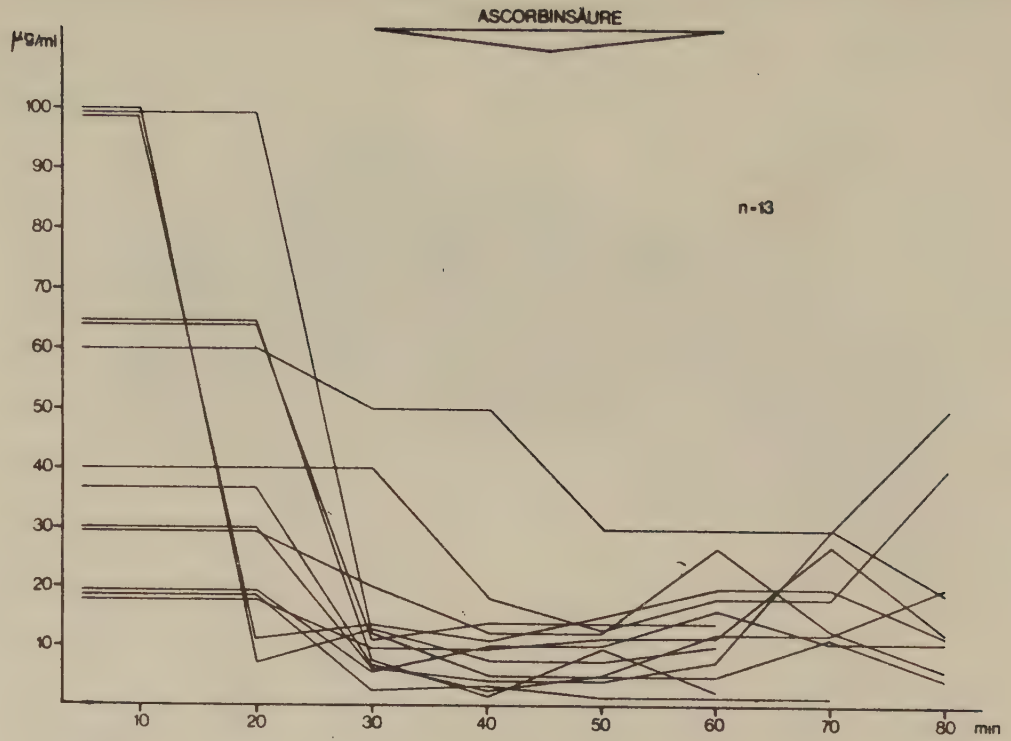

Abb. 7

Lysozymkonzentration im Sekret der Gl.submandibularis bei Ruhe und Ascorbinsäurereiz

4. Ig-A

Die Ig-A-Ruhesekretion zeigt eine Streubreite mit Werten von etwa 9 bis 18 mg %. Ascorbinsäurereiz führt zu einem Absinken der Werte um etwa 6 mg %. Sie bleiben bis zur Reizbeendigung überwiegend auf gleichem Niveau und steigen erst nach Beendigung der Stimulierung wieder an.

Bezieht man die gemessene Konzentration auf die sezernierte Menge der einzelnen Fraktionen, so ergibt sich folgender Kurvenverlauf: Ascorbinsäurereiz führt zunächst zu einer Erhöhung der Werte. Schon ab der 30-Minuten-Fraktion kommt es jedoch zum kontinuierlichen Abfall der Werte, der sich bis zur 80-Minuten-Fraktion fortsetzt und dort Werte erreicht, die leicht unter denen der Ruhesekretion liegen. Die Werte liegen vorwiegend zwischen 20 und 40 γ.
Siehe Abb. 8 und 9.

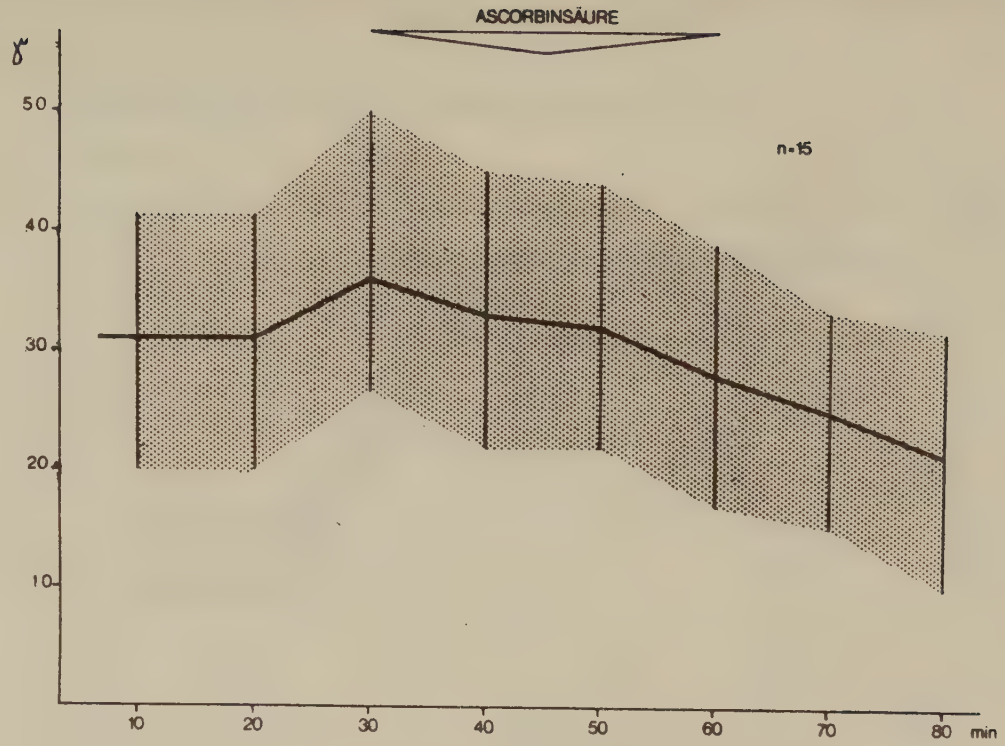

Abb. 8

Ig-A-Gesamtausscheidung im Sekret der Submandibularis bei Ruhe und Ascorbinsäurereiz

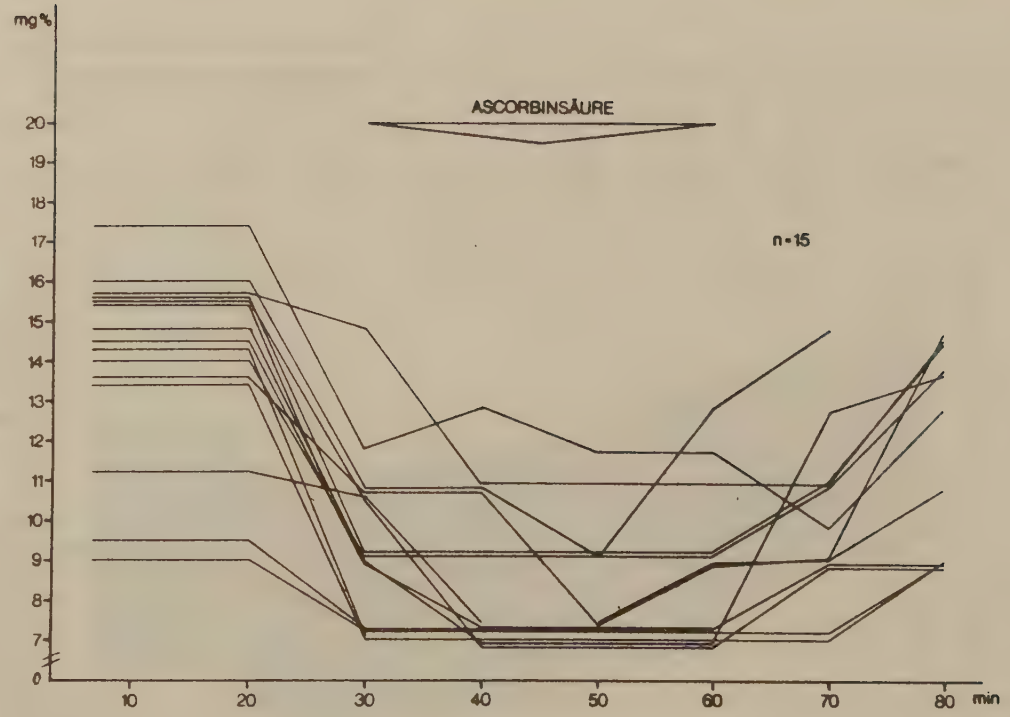

Abb. 9

Ig-A-Konzentration der Submandibularis bei Ruhe und Ascorbinsäurereiz

5. Elektrolyte: Na, K, Ca

Die mit dem Flammenphotometer gemessenen Elektrolytkonzentrationen in mval/Liter, bezogen auf ml pro Minute, ergeben folgendes Bild:

Na: Natrium zeigt einen deutlichen Anstieg der Werte sowohl mit zunehmender Abnahmedauer, als auch unter Stimulierung mit Vitamin C.

K, Ca: Kalium und Calzium zeigen diesen Anstieg nicht. Beide Male erhält man eine bandförmige Verteilung der Werte über die Zeitdauer der Abnahme. Die Kaliumwerte liegen in einem Bereich von 10 bis 25 mval/Liter, die Calziumwerte zwischen 0,5 und 2,5 mval/Liter; beides bezogen auf ml pro Minute.
Siehe Abb. 10, 11 und 12.

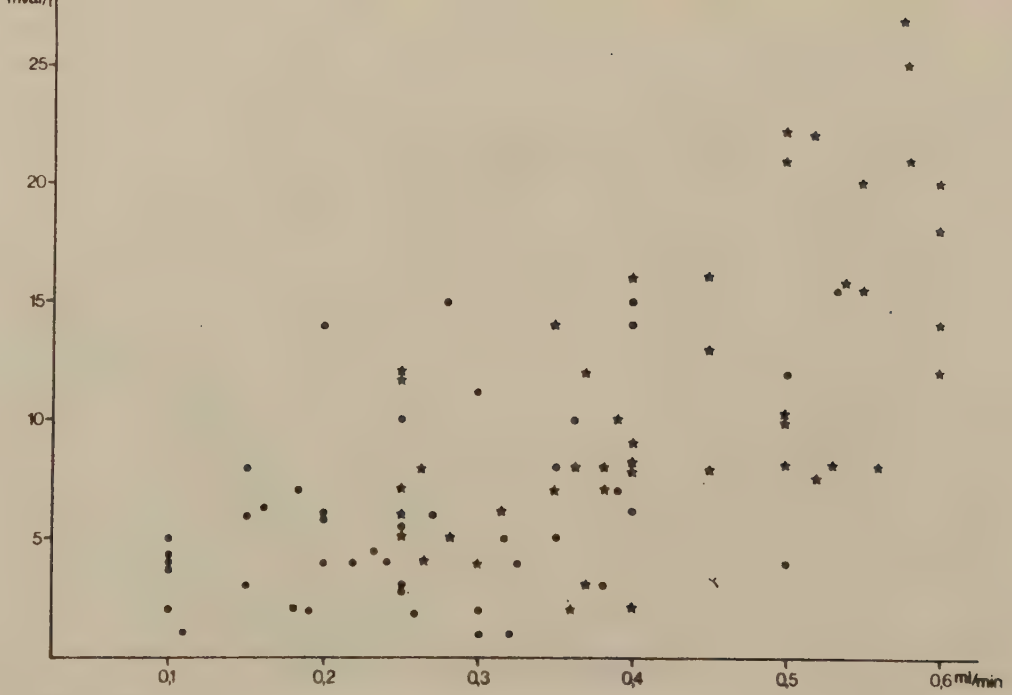

Abb. 10

Na-Konzentration in mval/l bezogen auf ml/min. im Sekret der Gl.submandibularis bei Ruhe und Ascorbinsäurereiz

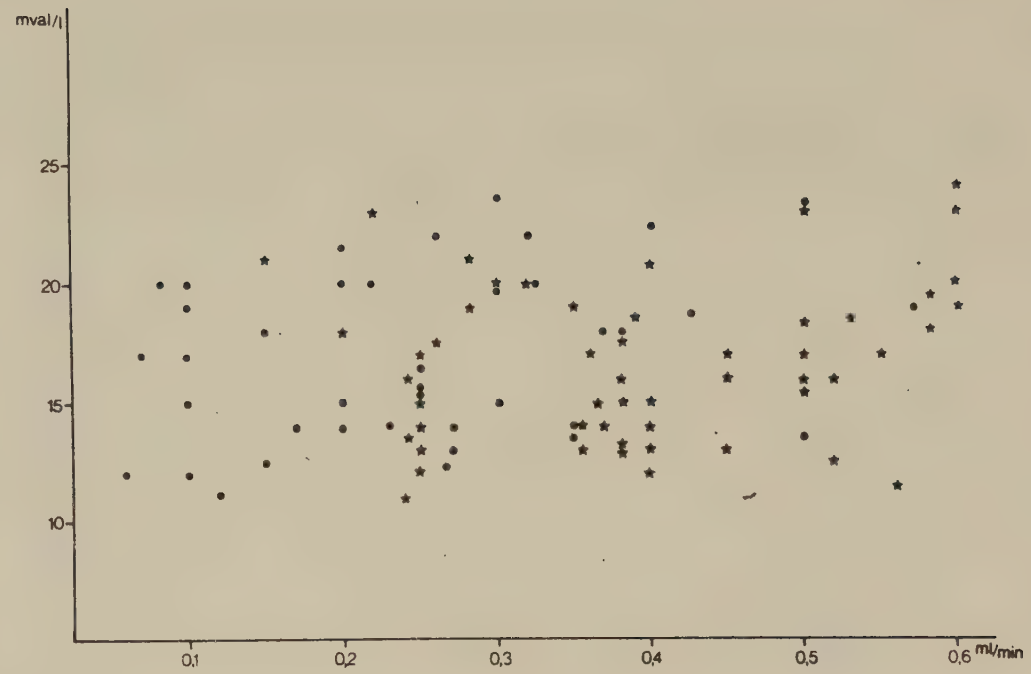

Abb. 11

K-Konzentration in mval/l bezogen auf ml/min. im Sekret der Gl.submandibularis bei Ruhe und Ascorbinsäurereiz

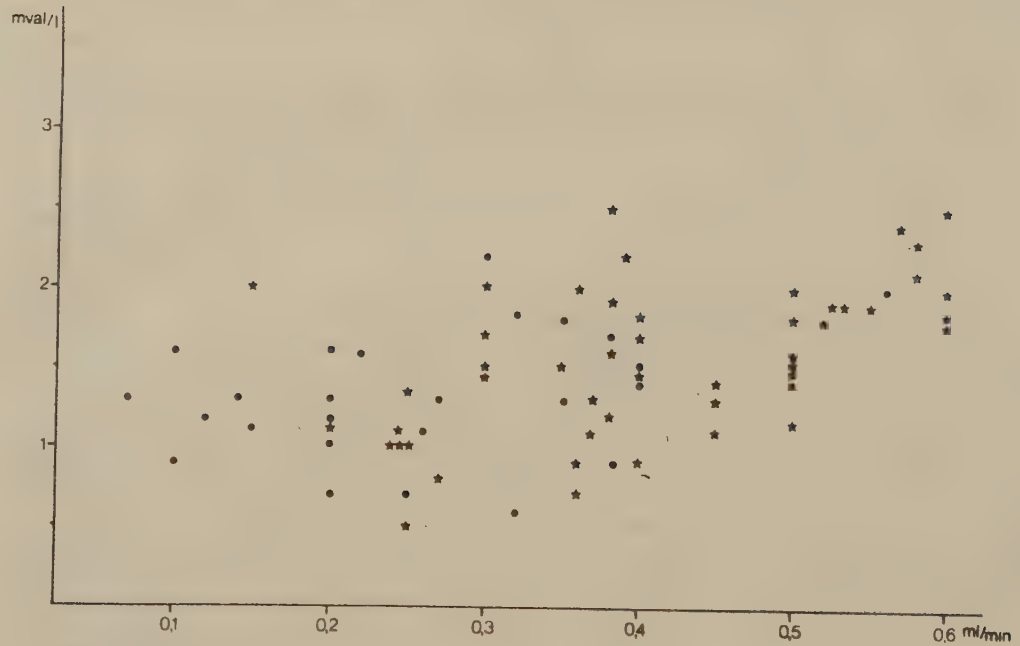

Abb. 12

Ca-Konzentration in mval/l bezogen auf ml/min. im Sekret der Gl.submandibularis bei Ruhe und Ascorbinsäurereiz

E) Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die von Shannon (20), Ferguson (1), Albegger (2) nachgewiesenen starken Zirkardianschwankungen berücksichtigt, indem wir die Sekretabnahme auf die Zeit von 9 - 11 Uhr vormittags beschränkten. Ferner wurden bei den 15 Probanden konstante Abnahmebedingungen eingehalten.
Da unter diesen Bedingungen für das Sekret der Gl.submandibularis bisher keine Ergebnisse vorliegen, lassen sich die gefundenen Werte meist nur mit Werten von Untersuchungen des Sekrets der Gl.parotis diskutieren, die unter etwa gleichen Bedingungen stattfanden.
Zu den Ergebnissen läßt sich Folgendes sagen:

Die für die Flußrate gefundenen Werte stimmen mit bisher veröffentlichten Ergebnissen, die auf identischen, aber auch auf verschiedenartigen Abnahmetechniken beruhen, überein (22).

Ebenso zeigt sich in der Gesamtproteinausscheidung generelle Übereinstimmung.
Die Werte der Gesamtproteinausscheidung in bis-

herigen Veröffentlichungen, in denen sie nach der Methode von Maurer bestimmt wurden, liegen in einem Bereich von 2 - 10 mg pro ml (21). Sie zeigen einen Anstieg der Werte mit ansteigender Flußrate. Beides läßt sich auch für die in dieser Arbeit gefundenen Werte feststellen.
Die Eiweißkonzentration des Submandibularissekretes ist ein wenig höher als die des Parotissekretes. Entsprechend finden sich in der Diskelektrophorese mehr Banden als bei der Parotis. Übereinstimmend mit der Proteinkonzentration des Parotissekretes (Rauch, 22) führt bei einem Großteil der Submandibularisdrüsen Ascorbinsäurereiz zu einer Abnahme der Proteinkonzentration. Hier zeigt sich die bekannte Abhängigkeit von der Art der Stimulation. Die Stimulation der Gl.parotis mit Pilocarpin weist einen gegenteiligen Effekt auf. Sie führt zu einem deutlichen Anstieg des Eiweißgehaltes im Sekret.

Der Vergleich der Diskelektrophorese des Sekretes der Gl.submandibularis mit der des Parotissekretes ergibt folgendes:
Bei der Submandibularis finden sich zusätzlich die Banden j und k. Es handelt sich um Phospho-

proteine, die im Parotissekret nicht oder in dieser Konzentration nicht vorhanden sind.
Die Bandengruppe d läßt sich nur in drei voneinander unterschiedene Banden trennen.
Die Bande f, die sich in der Elektrophorese des Ruhesekretes der Parotis deutlich anfärbt, ist wesentlich schwächer, oft nicht erkennbar.

Die sowohl in der Elektrophorese der Submandibularis, als auch in der der Parotis vorhandenen Banden, zeigen ein identisches Verhalten im Verlauf einer fraktionierten Abnahme unter Ruhe und Stimulation.
Bisher liegen keine vergleichbaren Untersuchungen über das Ig-A und Lysozymverhalten des fraktioniert gewonnenen Ruhe- und Reizsekretes der Gl.submandibularis vor.
Es läßt sich deshalb nur feststellen, daß sowohl Ig-A als auch Lysozym in ihren Werten und deren Verlauf innerhalb einer fraktionierten Abnahme unter Ruhe und Reiz, Übereinstimmung mit denen des Parotissekretes zeigen.

Die von uns gemessenen Konzentrationen der Elektrolyte Na, K und Ca stimmen mit den Ergebnissen überein (19), die mit anderen Methoden der Sekretgewinnung gefunden wurden.

F) Zusammenfassung

Aufgabe dieser Arbeit war es, das Sekretionsverhalten bei fraktionierter Abnahme unter Ruhe- und Reizbedingungen von Gesamteiweiß, dessen Auftrennung in der Diskelektrophorese, der Immunkörper Ig-A und Lysozym und der Elektrolyte Na, K und Ca der Gl.submandibularis zu untersuchen. Es sollten Normalwerte gefunden werden, die die Untersuchung des Sekretionsverhaltens bei Erkrankungen der Drüse ermöglichen.

Die Flußraten, d.h. die Meßung des pro Zeiteinheit sezernierten Sekretes, zeigen einen deutlichen Anstieg unter Ascorbinsäurereiz.
Die Gesamtproteinausscheidung steigt unter Reiz an und kehrt nach dessen Beendigung auf die Ausgangswerte zurück. Die Proteinkonzentration fällt bei der Mehrzahl der Drüsen bei Reizbeginn ab.
Die diskelektrophoretische Auftrennung der Proben ergibt eine Reihe von Banden. Veränderungen der Bandenmuster sowie der Farbintensität der Banden ermöglichen eine Unterscheidung zwischen Ruhe und Reiz.

Die Ig-A-Konzentration zeigt ebenfalls einen starken Abfall der Werte während des Reizes. Beendigung der Stimulation führt jedoch bei allen Drüsen zu einem Wiederanstieg der Werte. Die Ig-A-Gesamtausscheidung steigt in den ersten Reizfraktionen leicht an und nimmt dann kontinuierlich ab.
Die Meßungen der Elektrolyte in mval/Liter, bezogen auf ml pro Minute, ergibt für Kalium und Calzium eine bandförmige Verteilung der Werte über die gesamte Zeitdauer der Abnahme, für Natrium einen deutlichen Anstieg sowohl mit zunehmender Zeitdauer, als auch unter Stimulierung.

Alle durchgeführten Tests und Auswertungen zeigen weitgehende Übereinstimmung mit Ergebnissen des Sekretionsverhaltens der entsprechenden Parameter im Sekret der Gl.parotis (23).

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

(1) Ferguson, D.B. u.a.: Circadian rhythm in human parotid flow rate and composition, Arch. oral. Biol. 18 (1973) 1155

(2) Albegger, K.W., Müller, O.: Der tagesrhythmische Sekretionszyklus der Glandula submandibularis der Ratte, Arch. klin. exp. Ohr.-Nas.-und Kehlk.-Heilk. 204 (1973) 27

(3) Lashley, K.S.: Reflex secretion of the human parotid gland J. exp. Psychol. 1, 461 (1916)

(4) Skurk, A., Mlynski, G., Fendel, K.: Methoden der quantitativen Eiweißbestimmung im menschlichen Parotissekret, Acta oto-laryng. (Stockholm) 71, 1 (1971)

(5) Arneberg, P.: Quantitative determination of protein in saliva, Scand. J. dent. Res. 79, 60 (1971)

(6) Richterlich, R.: Klinische Chemie, Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M. (1965)

(7) Itzhaki, R.F. und Gill, D. M.: Analytic Biochem. 9, 401 (1964)

(8) Burgi, W.R., Richterlich, R. und Brinder, M.: Clin. chim. Acta (Amsterdam) 15, 181 (1967)

(9) Maurer, C.: Schnellbestimmung von Gesamtprotein im Liquor cerebrospinalis ohne Fällung mit einer modifizierten Biuret-Methode, Z. klin. chem. Biochem. 6 (1968) 217

(10) Caldwell, R.C. und Pigman, W.: Discelectrophoresis of human saliva in polyacrylamide gel, Arch. Biochem. Biophys. 110, 91 (1965)

(11) Fleming, A.: On remarkable bacteriologic elements found in tissues and secretions, Proc. roy. Soc. (London) Series B 93 (1922) 306

(12) Humphrey,J.H. und White, R.G.: Kurzes Lehrbuch der Immunologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1972

(13) Seligmann, M., Mihaesco, E., Hurez, D., Mihaesco, C., Prendhomme, J. L., Rambaud,J.C.: Immunochemical studies in four cases of alpha-chain disease, J. clin. Invest. 48 (1969) 2374

(14) Tomasi, T. B.: Structure and function of mucosal antibodies, Ann. Rev. Med. 21 (1970) 281

(15) Tomasi, T. B., Bienenstock, J.: Secretory immunoglobulins, Advanc. Immunol. 9 (1968) 1

(16) Hurlimann, J., Darling, H.: Synthesis of Immunglobulin A by salivary gland from animals of different Spezies, Immunology 20 (1971)

(17) Brandtzaeg, P.: Human secretory immunoglobulins III. Immunochemical and physiochemical studies of secretory Ig-A and free secretory piece, Acta path. microbiol. Scand 79 (1971) 165

(18) Hildes, J. A., Ferguson, M. H.: The concentration of electrolytes in normal human saliva Canad. J. Biochem. 33, 217 (1955)

(19) Schneyer, L. H., Young, J. A., Schneyer, C. A.: Salivary secretion of electrolytes, Physiol. Rev. 52, 720 (1972)

(20) Shannon, J. L., Suddick, R. P.: Effects of light and darkness on human parotid salivary flow rate and chemical composition, Arch. oral. Biol. 18 (1973) 601

(21) Münzel, M.: Die Biochemie der menschlichen Speicheldrüsensekrete, Arch. Oto-Rhino-Laryng., 213, 209 - 285 (1976)

(22) Rauch, S.: Die Speicheldrüsen des Menschen, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1959

(23) Eichner, H., Münzel, M., Bretzel, G.: Vergleichende Untersuchungen von Flußraten, Elektrolyt- und Gesamteiweißgehalt und disk-elektrophoretische Auftrennung des Sekretes an fraktioniert gewonnenem menschlichem Parotis-sekret, Z. Laryng. Rhinol. 54, 19 (1975)

Lebenslauf

Am 14.11.1946 wurde ich in Haßfurt/Main als Sohn des Assessors Karl-Friedrich Kölmel geboren.
Nach fünfjährigem Besuch der Volksschule trat ich in das Gymnasium ein und legte 1969 die Reifeprüfung ab.
Im Sommer 1970 begann ich das Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.Nach elfsemestrigem Studium bestand ich am 18.Dezember 1975 das medizinische Staatsexamen.Nach Ableistung meiner Medizinalassistentenzeit erhielt ich am 12. Juni 1978 meine Approbation als Arzt.